

浙江产蝮蛇 (*Agkistrodon halys* Pallas) 蛇毒血纤蛋白溶酶酶学性质的研究

涂光传 于 力 许金菊 冉永毅

(中国科学院昆明动物研究所)

摘 要

浙江产蝮蛇毒血纤蛋白溶酶是一种“金属蛋白酶”， Ca^{++} 和 Mg^{++} 明显地激活它水解酪蛋白的活力，但 Mg^{++} 、 Co^{++} 和 Cu^{++} 强烈抑制酶活力。金属螯合剂—EDTA 在 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 的浓度就能完全抑制酶活力，这种抑制能为 Ca^{++} 所解除。

该酶水解酪蛋白的最适 pH 大约为 8.5，最适温度在 40°C 左右。该酶对热很不稳定，在 37°C 保温就丧失活力。 Ca^{++} 能明显增强酶的对热稳定性，但 EDTA 降低这种对热稳定性。四种巯基化合物中，半胱氨酸降低酶对热稳定性的效果最为明显，其次为巯基乙醇和巯基乙酸，但谷胱甘肽 (GSH) 却不降低酶的对热稳定性。巯基试剂对氯汞苯甲酸 (PCMB) 和碘代乙酸对酶的对热稳定性也无影响。

与眼镜蛇科和海蛇科蛇毒不同，蝮亚科蛇毒富含精氨酸酯酶和非专一性蛋白水解酶。前者也是一种蛋白水解酶，只是作用专一性较强，而且对热稳定。

蛇毒精氨酸酯酶多与蛇毒的促凝作用有关，蛇毒蛋白水解酶则与蛇毒的抗凝和纤溶作用有关，人们对前者的研究远较后者深入。Oshima 等^[1, 2] 报道日本蝮蛇 (*Agkistrodon halys blomhoffi*) 蛇毒含有三个蛋白水解酶，即蛋白酶 a、b、c。其中蛋白酶 b 与蛇毒的出血活性有关，蛋白酶 c 与蛇毒的肿胀效应有关，蛋白酶 a 的药理作用尚不明瞭。

我们从浙江产蝮蛇毒中分离纯化了一种血纤蛋白溶酶，它不仅能水解酪蛋白，还能水解纤维蛋白，纤维蛋白原，第 V 因子和第 VIII 因子^[3, 4]。本文报道了该酶的某些酶学性质以及 Ca^{++} 、EDTA、巯基试剂和巯基化合物等物质对酶热失活速率的影响。

材 料 和 方 法

血纤蛋白溶酶：按照前文方法^[3]制备。

试剂：巯基乙醇，上海试剂四厂产品；巯基乙酸，上海第二军医大学产品；谷胱

甘肽 (GSH) 上海酵母厂产品; 碘代乙酸, 上海生化所东风厂产品。其他化学试剂均为国产分析纯试剂。

酶活性测定: 参照前文^[5]方法进行, 反应液中 Ca^{++} 的最后浓度为 $1 \times 10^{-3} \text{M}$, 但在三氯乙酸停止反应后, 直接测定滤液在 280nm 处的光吸收。

结 果

一、最适 pH 值

pH 对蝮蛇毒血纤蛋白溶酶水解酪蛋白的影响曲线如图 1 所示。

由图 1 可以看出, 酶作用的最适 pH 值大约为 8.5。

二、最适温度

温度对蝮蛇毒血纤蛋白溶酶水解酪蛋白的影响曲线如图 2 所示。

由图 2 可以看出, 酶作用的最适温度在 40°C 左右。

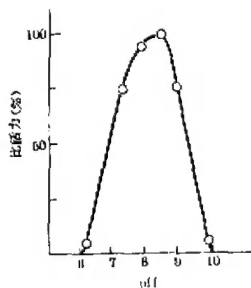


图 1

pH 对血纤蛋白溶酶的影响

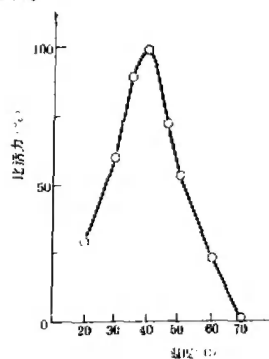


图 2

温度对血纤蛋白溶酶的影响

三、两价金属离子对酶活力的影响

两价金属离子在 $2 \times 10^{-3} \text{M}$ 浓度对酶活力的影响如表 1 所示。

表 1 两价金属离子对酶活力的影响

金属离子	对 照	Ca^{++}	Mg^{++}	Hg^{++}	Co^{++}	Cu^{++}
酶 活 力	100	147	110	5	28	25

由表 1 可以看出 Ca^{++} 和 Mg^{++} 对酶活力有明显的激活作用, 但 Hg^{++} 、 Co^{++} 和 Cu^{++} 却强烈地抑制酶活力。

四、EDTA 对酶活力的影响

金属螯合剂 EDTA 对酶活力的影响如表 2 所示。

表 2 不同浓度的EDTA对纤溶酶活力的影响

最后浓度(M)	0	1×10^{-5}	5×10^{-5}	1×10^{-4}	5×10^{-4}	1×10^{-3}	$1 \times 10^{-3} + 1 \times 10^{-2} \text{Ca}^{++}$
相对活力	100	96	91	50	0	0	164

由表 2 可以看出, $5 \times 10^{-4} \text{M}$ EDTA 就能完全抑制酶活力, 但这种抑制可以为 Ca^{++} 所解除。

五、 Ca^{++} 和 EDTA 对酶热失活速率的影响

蝮蛇毒血纤蛋白溶酶对热很不稳定, 在 37°C 保温就丧失活力, 从图 3 可以看出, 失活反应呈现很好的一级反应。

由图 3 还可以看出, Ca^{++} 能显著地增加酶对热的稳定性, EDTA 却降低酶对热的稳定性。

六、巯基化合物和巯基试剂对酶热失活速率的影响

试验了四种巯基化合物—半胱氨酸, 巯基乙醇、巯基乙酸和谷胱甘肽对酶热失活速率的影响, 其中以半胱氨酸增强酶热失活速率最为明显, 巯基乙醇次之, 巯基乙酸再次之, 谷胱甘肽不改变酶的热失活速率(图 4)。

两种巯基试剂—对氯汞苯甲酸和碘代乙酸都不影响酶对热的稳定性(图 4)。

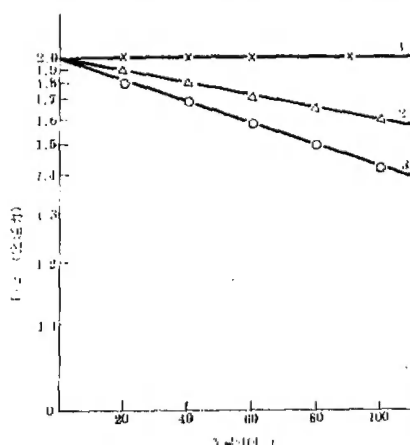


图 3

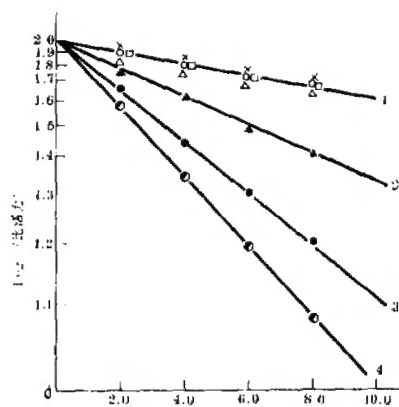


图 4

讨 论

蛇毒非专一性蛋白水解酶与来源于低等生物的蛋白水解酶相似, 是一类“金属蛋白酶”, 或称之为“金属整合剂灵敏蛋白酶”。它们都能为两价金属离子所激活, 但为金属整合剂所抑制。由表 1 和表 2 可以看出, 浙江产蝮蛇毒血纤蛋白溶酶亦是一种“金属

蛋白酶”， Ca^{++} 和 Mg^{++} 明显地激活它水解酪蛋白的活力，但 Hg^{++} 、 Co^{++} 和 Cu^{++} 却强烈地抑制酶活力。EDTA 在 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 浓度就能完全抑制酶活力。

图 3 的结果表明， Ca^{++} 还能显著地增强血纤蛋白溶酶的对热稳定性。这很可能是由于 Ca^{++} 能够稳定酶的特殊构型，因而它对酶呈现活力是必需的。

四种巯基化合物都能增强蝮蛇毒血纤蛋白溶酶的热失活速率，考虑到它们可能与酶分子发生-S-S-链交换反应，提示酶分子中的-S-S-键对于维系蛋白构型亦是十分重要的。

参 考 文 献

1. Oshima, G. et al., Studies on snake venoms XIX. Purification and some physicochemical properties of proteinase a and c from the venoms of *Agkistrodon halys blomhoffi*. J. Biochem. 1968, 64, 227.
2. Oshima, G. et. al., Some properties of proteinase b in the venom of *Agkistrodon halys blomhoffi*. Biochim. Biophys. Acta. 200, p. 416.
3. 叶智彰等, 浙江产蝮蛇毒纤溶组份对凝血系统的作用. 动物学研究, 1981, 2, 1, 33.
4. 阮长耿等, 蝮蛇蛇毒纤溶酶对纤维蛋白原的作用. 动物学研究, 1981, 2, 2, 163.
5. 阮长耿等, 浙江产蝮蛇毒对凝血系统的作用. 生物化学与生物物理学报, 1979, 1, 19.

STUDIES ON THE ENZYMATIC PROPERTIES OF THE FIBRINOLYTIC ENZYME OF *AGKISTRODON HALYS* PALLAS VENOM (FROM ZHEJIANG PROVINCE)

Tu Guang-chou Yu Li Xiu Jing-jiu Ran Yong-lu
(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

ABSTRACT

The fibrinolytic enzyme was found to be a kind of "metalloproteinase", Ca^{++} and Mg^{++} ions activated, whereas Hg^{++} , Co^{++} , and Cu^{++} ions inhibited it. EDTA, $5 \times 10^{-4}\text{M}$, fully inhibited the proteolytic activity of the enzyme. The inhibition could be reversed by adding Ca^{++} or Mg^{++} ions.

With casein as the substrate, the optimal pH of the fibrinolytic enzyme was about 8.5 and the optimal temperature about 40°C .

The enzyme was highly heatlabile and lost its activity at 37°C . The inactivation was shown to be a clearcut firstorder reaction. Ca^{++} ion increased but EDTA reduced the heatstability of the enzyme. CySH , thioacetic acid and mercaptoethanol reduced the heatstability of the enzyme, but GSH , PCMB and iodoacetic acid did not cause any change in its heatstability.